

V 3125

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Januar 2001 (25.01.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**PCT WO 01/05432 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 47/48** D-69514 Laudenbach (DE). DEBUS, Jürgen [DE/DE]; Kreuzstrasse 11, D-76698 Stettfeld (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE00/02346**
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
14. Juli 2000 (14.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 33 492.7 16. Juli 1999 (16.07.1999) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS** [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-60120 Heidelberg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BRAUN, Klaus** [DE/DE]; Am Schwanenweiher 6, D-67105 Schifferstadt (DE). **PESCHKE, Peter** [DE/DE]; Maximilianstrasse 16, D-67459 Böhl-Iggelheim (DE). **FRIEDRICH, Eckart** [DE/DE]; An den Hofwiesen 6, D-76831 Landau-Ilbesheim (DE). **PIPKORN, Rüdiger** [DE/DE]; Adolf-Rauch-Strasse 3, D-69120 Heidelberg (DE). **WALDECK, Waldemar** [DE/DE]; Tilsiter Strasse 49,
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**  
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **CONJUGATE FOR MEDIATING CELL, COMPARTMENT OR MEMBRANE-SPECIFIC TRANSPORT OF ACTIVE SUBSTANCES**

**WO 01/05432 A2** (54) Bezeichnung: **KONJUGAT ZUR VERMITTLUNG EINES ZELL-, KOMPARTIMENT- ODER MEMBRANSPEZIFISCHEN TRANSPORTS VON WIRKSUBSTANZEN**

(57) Abstract: The invention relates to conjugates for mediating cell, compartment or membrane-specific transport of active substances. The invention also relates to a method for the production of said conjugates and to the utilization thereof. The conjugates comprise a transport mediator for the cell membrane; a cell, compartment or membrane-specific address protein or peptide and an active substance to be transported.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membran-spezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen: einen Transportvermittler für die Zellmembran; ein zell-, kompartment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid; und einen zu transportierenden Wirkstoff.

Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für viele Stoffe (z.B. Nukleinsäuren, Proteine, chemische Substanzen) sind, die von außen in die Zelle eingebracht werden sollen. Zum Einbringen von Nukleinsäuren können Zellmembranen durch physikalische Prozesse (Transfektion bei Eukaryonten, Transformation bei Prokaryonten) und biologische Vorgänge (Infektion) überwunden werden. Der Transformation, d.h. dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle, geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser "kompetenten Zellen" stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (J. Mol. Biol. 53, S. 159-162 (1970)), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals von Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, S. 2210-2114 (1972)) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden. Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryontische Zellen, sondern auch in eukaryontische Zellsysteme einzuschleusen (Weaver et al., J. Cell Biochem. 51, S. 426-435 (1993)). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryontische Zellen wurden von Sikes et al. (Hum. Gen. Therap. 5, S. 837-840 (1994)) bzw. Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, S. 9568-9572 (1990)) entwickelt. Sie beruhen auf der direkten Injektion der DNA in

einzelne Zellen (Mikroinjektion) bzw. auf dem Beschuß einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffende Nukleinsäure gebunden wurde ("Gene gun"). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich biologische Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (Chatterjee et al., Science 258, S. 1485-1486 (1992); Cossett and Russell, Gene Therapy 3, S. 946-956 (1996); Bilbao et al., FASEB J. 11, S. 624-634 (1997)) sowie die über Liposomen vermittelte Lipofektion (Bennett et al., J. Drug Targeting 5, S. 149-162 (1997)). Weiter sind Standardmethoden des liposomalen Transports (Gao and Huang, Gene Therapy 2, S. 710-722 (1995); Akhtar et al., Nucl. Acid. Res. 19, S. 5551-5559 (1991)) und die Poly-L-Lysinierung (Leonetti et al., Bioconj. Chem. 1(2), S. 149 (1990) von Wirksubstanzen zu nennen, um diese in Zellen einschleusen zu können.

Trotz der oben aufgezählten Vielzahl von Methoden, die zellulären Membransysteme zu überwinden, gibt es noch keine universelle Methode, um unterschiedliche Wirkstoffe in Zellen hineinzubringen. Alle aufgeführten physikalischen und biochemischen Methoden sind artifiziell und unphysiologisch, insofern als sie nicht zellimmanente Mechanismen nutzen. Viren als Transportmittel sind zum gegenwärtigen Stand immer noch nicht sicher frei von Toxizität und oft auch nicht effektiv. Sie werden auch vom Immunsystem erkannt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, eine Möglichkeit zu entwickeln, die das gerichtete und spezifische Einschleusen von Wirkstoffen in Zellen und Kompartimente erlaubt. Es sind dabei folgende Anforderungen zu erfüllen:

- universelle Anwendbarkeit
- zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
- hohe Effektivität
- geringe Immunogenität

- Minimierung des Infektionsrisikos
- ausreichend lange Verweildauer

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Von den Erfindern wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten aufweist:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P"),
- ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid ("AP"), und
- einen zu transportierenden Wirkstoff ("W").

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

**P - AP - W**

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

**P - AP - SP - W**

Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., 1998, Trends Cell Biol. 8, S. 84-87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The FASEB Journal (1998), Vol. 12, S. 68 ff.). wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH<sub>2</sub>-RQIKIWFQNRMRMKWKK-  
(NH<sub>2</sub>-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-)

Weitere Beispiele für das Transportprotein "P" sind:

### *Virales Transportprotein*

PTD	Proteintransduktionsdomäne	[TAT/HIV-1]
1-Buchstaben Code	H <sub>2</sub> N-YGRKKRRQRRR-COOH	
3-Buchstaben Code	H <sub>2</sub> N-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg	

### *Bakterielles Transportmolekül*

TP	Proteintransportdomäne	TP(Eco)
1-Buchstaben Code	H <sub>2</sub> N-MTRQTFWHRIKH-COOH	
3-Buchstaben Code	H <sub>2</sub> N-Met-Thr-Arg-Gln-Thr-Phe-Trp-His-Arg-Ile-Lys-His-	

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963).

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplast, Endoplasmatisches Retikulum) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Die Länge dieses Adresspeptids bzw. -proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung von Wirkstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zell- kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch den angehängten Wirkstoff an seinen Wirkort dirigieren. Zur Auswahl stehen "AP", die Wirkstoffe in Gegenwart oder

Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Grundsätzlich ist für den Transport in das Zellkompartiment die reine Adressequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zielkompartiments das Abspalten der Adressequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Beispiele für Adressproteine bzw. -peptide sind:

Import in das ER

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

Reimport in das ER

H<sub>2</sub>N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO<sup>-</sup>

Import in Mitochondrien

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu

Import in den Zellkern

-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen;)

Import in Peroxisomen

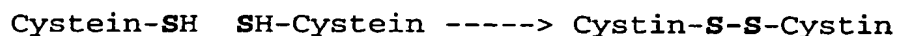
H<sub>2</sub>N-Ser-Lys-Leu-COO<sup>-</sup>

Bindung an die Zellmembran

 $H_3N^+$ -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-  
Lys-Pro-Lys-

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein/-peptid und dem zu transportierenden Wirkstoff befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann beispielsweise ausgewählt sein aus: Polylysin, Polyethylenglykol (PEG), Derivate der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z.B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellimmanente Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, 1998, Annu. Rev. Gent 32, S. 163-84):



Der Wirkstoff bzw. die Wirksubstanz (vorstehend mit "W" abgekürzt) unterliegt keinerlei Beschränkungen. Er ist frei wählbar, je nach Wunsch, welche Wirkung in einer Zelle erzeugt werden soll. Der Wirkstoff kann ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum sein. Es kann auch mehr als ein Wirkstoff in dem Konjugat vorhanden sein. Der Wirkstoff kann ggf. markiert sein, z.B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Der Wirkstoff kann eine Nukleinsäure, ein Protein bzw. Peptid, eine chemische Substanz usw. sein. Beispielsweise seien genannt: cDNA, genomische DNA, vollständige Gene, regulatorische Elemente, Transkriptionsfaktoren, Molekularsonden, Oligonukleotide, mRNA, mTRNA, Antisense-RNA, Antisense-Oligonukleotide, Plasmide, virale DNA, synthetische Nukleotide, PNA (Peptide Nucleic Acids), einzelne Aminosäuren

und deren Derivate, Peptide, Proteine, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper, pharmazeutische Wirkstoffe, Chemotherapeutika, Farbstoffe, Sensibilisatoren, Partikel.

Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach der Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963) Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder Wirkstoff) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einfügung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und dem Wirkstoff bzw. dem Adressprotein und dem Wirkstoff liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

Das Konjugat wird bevorzugt in folgenden Schritten aufgebaut:

- 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers (z.B. nach der Merrifield-Methode)
- 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
- 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung (z.B. in Wasser/DMSO)
- 4) Reinigung (z.B. mittels HPLC)

Die erfindungsgemäßen Konjugate haben den Vorteil, unabhängig von Art und Größe eines Wirkstoffs, diesen in Zellen einbringen und in das gewünschte Zellkompartiment transportieren zu können. Es ist somit eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie in Human- und Tiermedizin sowie eine Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung zu erwarten. Insbesondere die Gentherapie kann durch die erfindungsgemäßen Konjugate einen Aufschwung erwarten, da vollständige Gene einschließlich ihrer regulatorischen Elemente transportierbar werden. Aber auch alle anderen Wirkstoffe lassen sich mit den



erfindungsgemäßen Konjugaten spezifischer an den Wirkort bringen, was das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert. Es wurde gefunden, daß Konjugate bis 25 MDa in das Zellinnere einzubringen sind. Darüber hinaus kommt es oftmals zur Auslösung von Apoptose, was durchaus ein gewünschter Effekt sein kann. Die erfindungsgemäßen Konjugate zeichnen sich durch eine universelle Einsetzbarkeit aufgrund ihres zell-, kompartiment- und membranspezifischen Einschleusungsverhaltens aus.

Die Erfindung wird weiter anhand der beigefügten Figuren beschrieben:

Fig. 1: erfindungsgemäßes Konjugat

Fig. 2: Generelles Schema der Fmoc-Synthese

Fig. 3: Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messung an AT1-Zellen

- A) Konjugat-Konzentration: 50 nM  
Inkubationszeit: 5 Std.
- B) Konjugat-Konzentration: 5 nM  
Inkubationszeit: 5 Std.
- C) Konjugat-Konzentration: 50 nM  
Inkubationszeit: 24 Std.
- D) Konjugat-Konzentration: 5 nM  
Inkubationszeit: 24 Std.

Fig. 4: Konzentrations- und zeitabhängiger Transport von Rhodamin<sup>110</sup> (L)-Penetratin/RPMI-Medium.  
DU145-Zellen: Inkubation mit 20  $\mu$ M und 100 pM Endkonzentration

Fig. 5: Beispiele für erfindungsgemäße Konjugate

Fig. 6: Herstellung von PNA-Konstrukten

Fig. 7: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch

### Einbringen eines anti-sense Konstrukts

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

**Beispiel 1:** Konjugat aufweisend einen Penetratin-Bestandteil, eine NLS, einen Polylysin-Spacer und Rhodamin

Zum Aufbau des Konjugats wird auf Fig. 1 verwiesen.

Penetratin:  $\text{NH}_2\text{-RQIKIWFQNRRMKWKK-}$

NLS (Nuclear Localisation Sequence):  $\text{NH}_2\text{-PKKKRKV}$

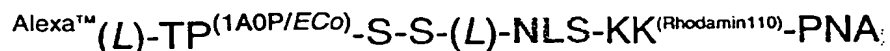
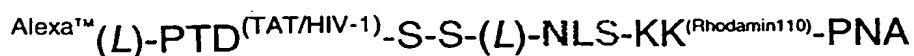
Spacer (= (Lys)<sub>2</sub>):  $\text{NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHNH}_2\text{-CO-NH}$

Die Penetratinsequenz, die NLS und der Spacer wurden nach der Standard Fmoc-Methode ("Peptide", H.-D. Jakubke, Chemie und Biologie Spektrum, Akad. Verl. 1996, ISBN 3-8274-0000-7) getrennt synthetisiert. Das generelle Schema der Fmoc-Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Synthese der verschiedenen Komponenten-Sequenzen wird zuerst die erste Fmoc Aminosäure (käuflich erhältlich von Fa. Calbiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) an ein unlösliches Polystyrol-Trägerharz über einen säurelabilen Linker (= para-Benzyl-oxybenzyl-alkohol-handle) angefügt. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in Dimethylformamid erreicht. Die zweite Fmoc-Aminosäure wird unter Verwendung einer präaktivierten Spezies (z.B. in den Aminosäure-Einzelbestandteilen vorhandenen Succinimid-, Pentafluorphenylester- oder p-Nitrophenylestergruppen) oder in-situ Aktivierung angekoppelt, jeweils nachdem von der vorhergehenden Aminosäure die Schutzgruppe durch basische Behandlung entfernt worden ist. Jede weitere Aminosäure wird analog angekoppelt. Nachdem das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist, wird dieses mittels Behandlung mit

95% Trifluoressigsäure (TFA) + 5% Scavenger (z.B. Triethylsilan) von dem Träger entfernt und die Schutzgruppen abgespalten. Die entstandenen Roh-Peptide werden durch präparative HPLC auf einer YMC ODS-A 7A S-5 $\mu$ m Umkehrphasensäule (20 x 250 mm) unter Verwendung eines Elutionsmittels enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) bzw. 60% wässrigem Acetonitril (B) gereinigt. Die Peptide wurden mit einem sukzessiven linearen Gradienten von 25% B bis 60% B in 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min. eluiert. Die den gereinigten Peptiden entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Die aufgereinigten Peptid-Komponenten werden gemeinsam mit 20%iger wässriger DMSO-Lösung über 5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, wodurch eine oxidative Kopplung der Komponenten resultiert. An den Spacer wird als zu transportierende Wirksubstanz, z.B. Rhodamin 110, gekoppelt. Dies erfolgt durch Säureamid-Kopplung an der freien  $\alpha$ -Aminogruppe des Lysinspacers. Das komplette Konjugat wird anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Analog wurden die weiteren erfindungsgemäßen Konjugate hergestellt:



PNA = NH<sub>2</sub>-TTA AGG AGG CTC-COOH (Beispiel für Wirkstoff)

Alexa 350 = Farbstoff (Fa. Molecular Probes, USA)

**Beispiel 2: Einbringen eines erfindungsgemäßen Konjugats in Zellen**

AT-1 (Ratten-Prostata-Carcinoma) und DU-145 (menschliche

Prostata-Carcinoma, ATCC HTB-81) Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) läßt man AT-1 bzw. DU-145 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) wird das Penetratin-enthaltende Konjugat von Beispiel 1 (100 nM) mit RPMI auf die Zellen gegeben und 5, 24 bzw. 48 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen und anschließend per FCS gemessen. Die Anregung mit dem Laser erfolgt bei 488 nm und die Emission bei 538 nm.

Das Konjugat wird auf dem Weg in den Zellkern verfolgt. Dazu wird unter dem Lichtmikroskop eine Zelle ausgewählt focusiert. Nach Focusierung und Justierung des Lasers wird in 100 µm Schritten durch die Zellen gefahren, und die Fluoreszenz wird in Form von Lichtblitzen über Photomultiplier gemessen. Dabei wandern große Moleküle und kleine Moleküle unterschiedlich schnell. Erfasst wird die Anzahl der diffundierenden Moleküle in einem Bereich von jeweils 100 µm. So läßt sich mit der Signaldauer die Größe der diffundierten Moleküle bestimmen. Die dazugehörige Grafik ist in Fig. 3 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wird die Kinetik, mit der das Konjugat ins Cytoplasma gelangt, mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die AT-1 Zellen wurden wieder 24 Std. adhärirt. Das das Konjugat enthaltende Medium wurde wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Allerdings wurde jetzt sofort das Fluoreszenzsignal mit der FCS gemessen.

Die FCS zeigte deutlich eine starke Anreicherung an der Zellmembran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Eine Diffusion war nicht zu erkennen. Nach 24 Std. Inkubationszeit zeigten sich nur noch geringfügige Mengen an Konjugat in der Zellmembran. Auffällig war jetzt eine Anreicherung im Kern, die sich im

Beobachtungszeitraum von 48 Std. noch verstärkte.

Zur Kontrolle wurden Konjugate eingesetzt, bei denen Rhodamin 110 entweder nur an Penetratin oder an NLS gebunden war. Diese zeigten nicht den vorstehend beschriebenen Effekt der Zellkernanreicherung. Die Konjugate wurden, falls sie überhaupt den Übertritt in die Zelle schafften, an der Zellmembran bzw. der Nuclearhülle angehalten und reicherten sich dort an.

Analog wie vorstehend beschrieben wurden alle in Beispiel 1 hergestellten Konjugate hinsichtlich ihres zeitabhängigen intrazellulären Transports in das Zytoplasma (Z) bzw. den Zellkern (N) untersucht. Die Inkubationszeiten waren jedoch abweichend von den vorstehend angegebenen Inkubationszeiten 1, 3, 6, 10 und 24 Stunden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt.

### **Beispiel 3: Konzentrationsabhängiger Transport**

Es sollte untersucht werden, inwieweit die Konzentration des Transportpeptids <sup>Rhodamin110</sup>(L)-Penetratin/RPMI-Medium den zellulären und kerngerichteten Transport auch zeitabhängig beeinflussen. Verglichen wurde die Fluoreszenz von 20  $\mu\text{M}$  und 100 pM Endkonzentration <sup>Rhodamin110</sup>(L)-Penetratin/RPMI-Medium. Dazu wurden DU-145 Zellen 1, 6, 12, 24 und 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wird dreimal mit RPMI (ohne Penetratin), einmal mit PBS und nochmals mit RPMI. Nach Versehen der Zellen mit Objektträgerdeckeln wurde umgehend die Fluoreszenz mittels der CLSM (Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 4 gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß mit einer hohen Konzentration von über 20  $\mu\text{M}$  ein unspezifischer Transport stattfindet, was auf Zytotoxizität hindeutet. In einer darunterliegenden Konzentration dagegen findet ein spezifischer Transport ins Zytoplasma statt.

**Beispiel 4: Hemmung der Proliferation von AT-1 Zellen durch Einbringen eines Anti-sense Konstrukts**

Es wurden unter analoger Anwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Methode Peptid-Konjugat-Konstrukte gemäß Fig. 6 hergestellt. Dabei war der Wirkstoff einmal ein PNA mit der Sequenz NH<sub>2</sub>-TAC TGC GAC TCC GG-COOH (anti-sense zu Ratten P2-Promotor c-myc = PNA<sub>AS</sub>) und einmal eine Non-sense ("random") Sequenz mit der Nukleotidabfolge NH<sub>2</sub>-TTA AGG AGG CTC-COOH (=PNA<sub>NS</sub>).

AT-1 Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin.

Man läßt AT-1 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstofffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) werden die Konjugate (100 nM) jeweils mit RPMI auf die Zellen gegeben und 24, 48, 72 bzw. 96 Std. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstofffreiem RPMI gewaschen. Es erfolgt mittels der Coulter-Counting-Methode die Bestimmung der Zellzahl von AT-1 Zellen.

Als Kontrolle wurden unbehandelte AT-1 Zellen verwendet. Eine weitere Kontrolle stellt unligiertes PNA<sub>AS</sub> dar. Diese Kontrollen wurde analog wie vorstehend beschrieben mit den AT-1 Zellen inkubiert.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Fig. 7 gezeigt. Eine Hemmung der Proliferation von AT-1 erfolgte nur nach Verabreichung des Anti-sense Konstrukts, d.h. hiermit ist klar gezeigt, daß nur mittels des erfindungsgemäßen Konstrukts ein Eintritt in den Zellkern erfolgt und die Anti-sense Sequenz die gewünschte Wirkung dort entfalten kann. Unligierte Anti-sense Sequenz ist genauso wirkungslos wie die Kontrolle oder ein Konstrukt, das nicht mit einer der AT-1 Sequenzen

hybridisieren kann.

### Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports, wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:
  - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
  - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
  - einen zu transportierenden Wirkstoff.
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist oder ein bakterielles oder virales Transportprotein ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eines der Penetratine folgende Sequenz hat:

NH<sub>2</sub>-RQIKIWFQNRMRMKWKK-

5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zell-, kompartiment- oder membranspezifische Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:

für Import in das ER

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-

für Reimport in das ER

H<sub>2</sub>N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO<sup>-</sup>



für Import in Mitochondrien	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu
für Import in den Zellkern	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val  H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen)
für Import in Peroxisomen	H <sub>2</sub> N-Ser-Lys-Leu-COO <sup>-</sup>
für Bindung an die Zellmembran	H <sub>3</sub> N <sup>+</sup> -Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-

6. Konjugat nach Anspruch 5, wobei die Sequenz für den Import in den Zellkern folgende Sequenz hat:

H<sub>3</sub>N<sup>+</sup>-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-

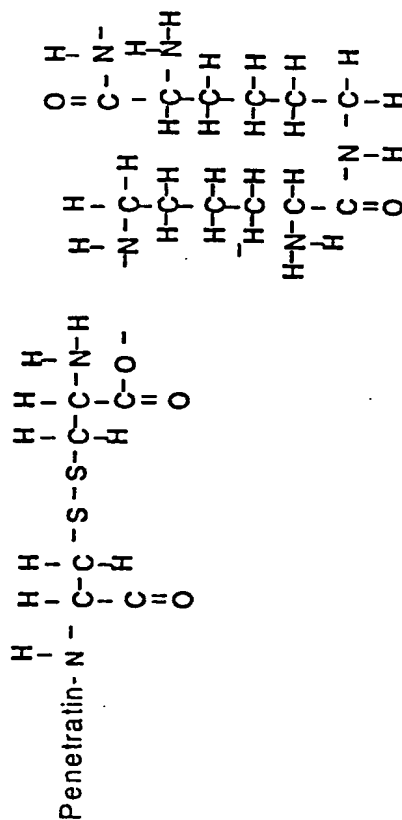
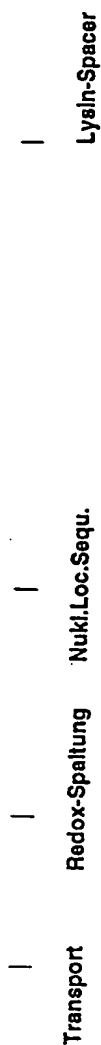
7. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus Nukleinsäuren, Proteinen/Peptiden und/oder chemischen Substanzen.
8. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

Transportvermittler - Adressprotein - Wirkstoff

9. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.
10. Konjugat nach Anspruch 9, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und dem Wirkstoff befindet.
11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 aufweisend die folgenden Schritte:
  - 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers
  - 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
  - 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Peptidsynthese gemäß der bekannten Merrifield-Methode durchgeführt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Redoxkopplung in einer wässrigen DMSO-Lösung durchgeführt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-14, wobei sich noch ein Reinigungsschritt anschließt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Reinigung mittels HPLC stattfindet.
17. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 zum zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport eines gewünschten Wirkstoffs.
18. Verwendung nach Anspruch 17 zum Einsatz in Diagnose und/oder Therapie.

## PNA-Konjugat Konstrukt - Schema

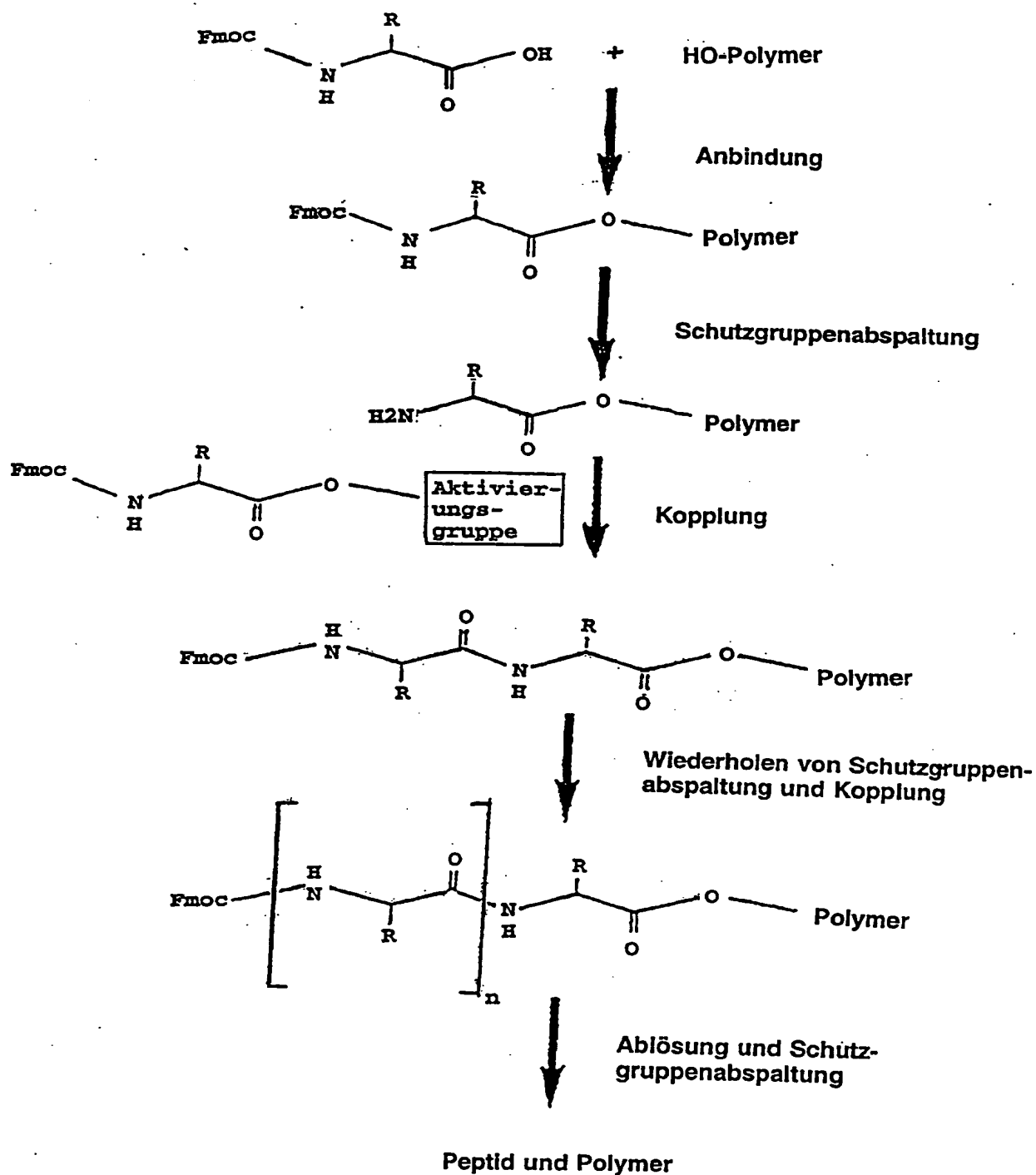


Transportprotein	Cystin Redox-Trennstelle	Nuklear Localisation	Sequenz	Spacer	spezif. Sequenz
<p>  </p>	<p>  </p>	<p>  </p>	<p>  </p>	<p>  </p>	<p>  </p>

Penetratin: P: (pAntp): RQIKIWFGQRRRMKWKK-

NLS: (Nucl. Localls. Signal) PKKKRKV

**Fig. 1**



Allgemeines Schema for Fmoc Synthese

Fig. 2

# Zelluläre Aufnahme des erfindungsgemäßen Konjugates

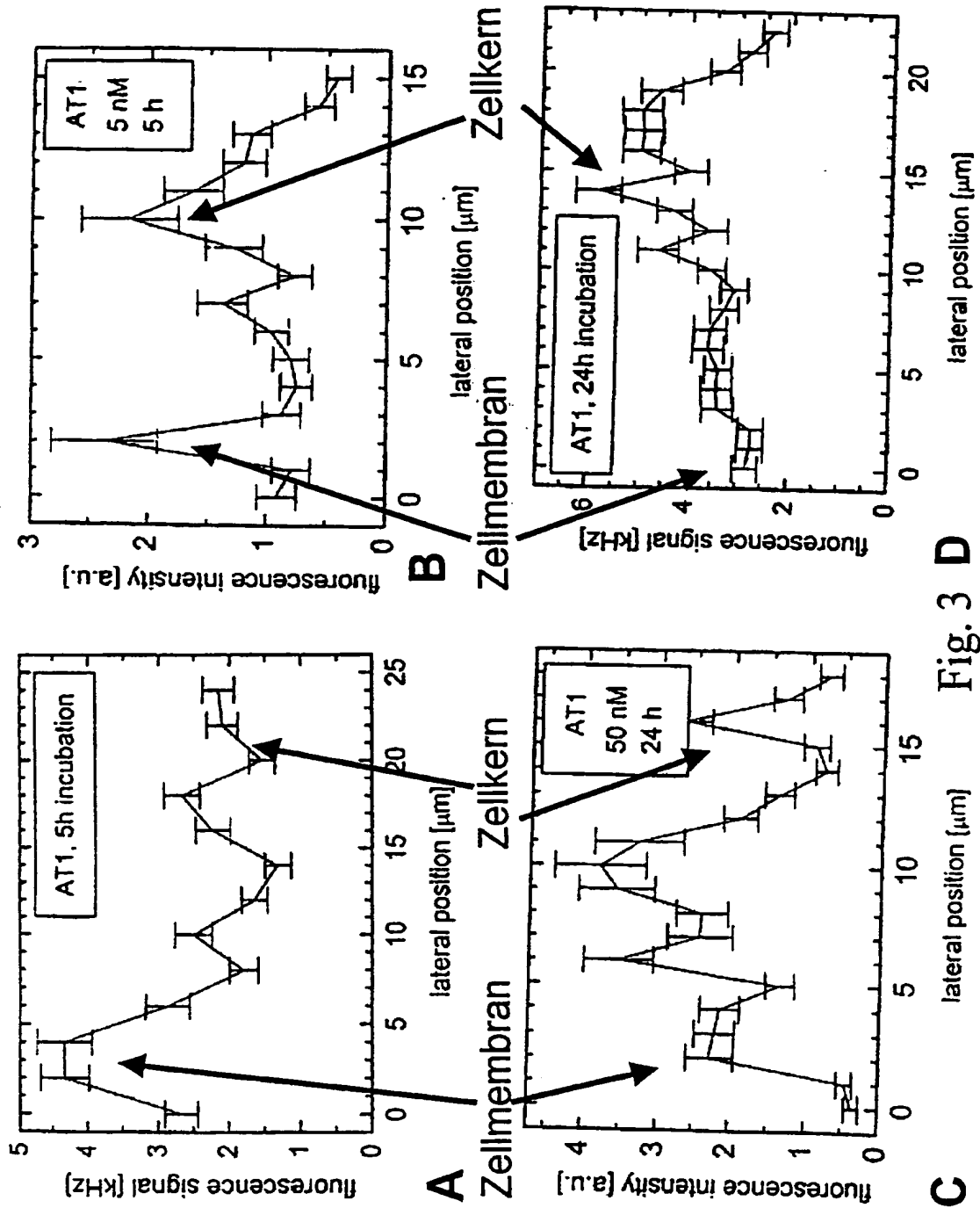


Fig. 3 D

lateral position [ $\mu\text{m}$ ]

C

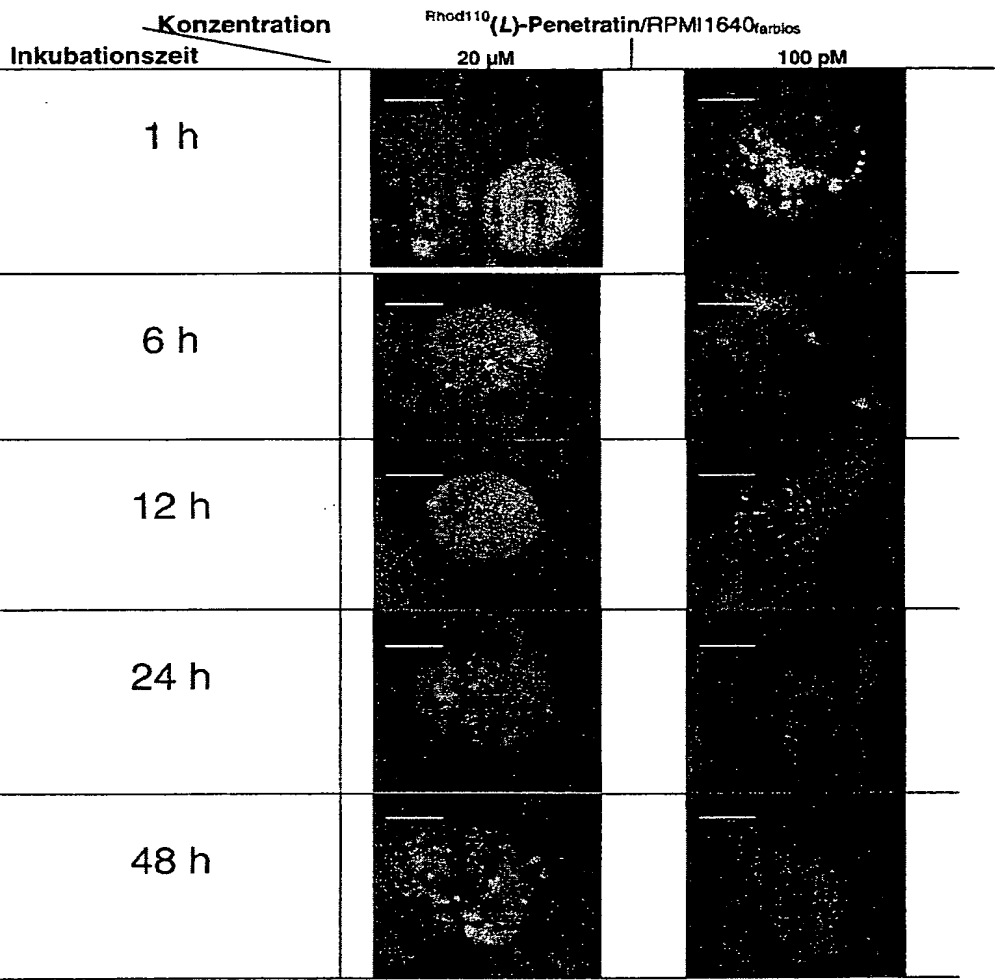


Fig. 4

## „Bioshuttle“ - Schema des modularen Aufbaus

Transportmodul -S-S- Adressmodul Spacer Wirksubstanz

Penetratin-1	-S-S-	Nucl. Local Sequ.	Lys/Glyc	PNA; DNA; S-ODN
PTD TAT/HIV-1	-S-S-	Endoplasm. Retik.	Lys/Glyc	Antikörper
TP <sup>1AOP/Eco</sup>	-S-S-	Mitochon. directed	Lys/Glyc	Pro-Drugs
TPF human	-S-S-	Peroxis. directed	Lys/Glyc	Drugs

Fig. 5

# Peptid-Konjugat Konstrukt - Schema - [Modularer Aufbau]

zum Nachweis einer cytoplasmatischen Di-Sulfid Redoxspaltung: jede Seite des Disulfid-Konstrukts trägt ein unterschiedliches Fluorophor, wie unten gezeigt; nach der Di-Sulfid-Spaltung befinden sich die Farbstoffe separat in unterschiedlichen Kompartimenten (Cytoplasma; Nucleus).

Modul 1: (MW 2517)  
Alexa-Penetratin-Cy-S-H

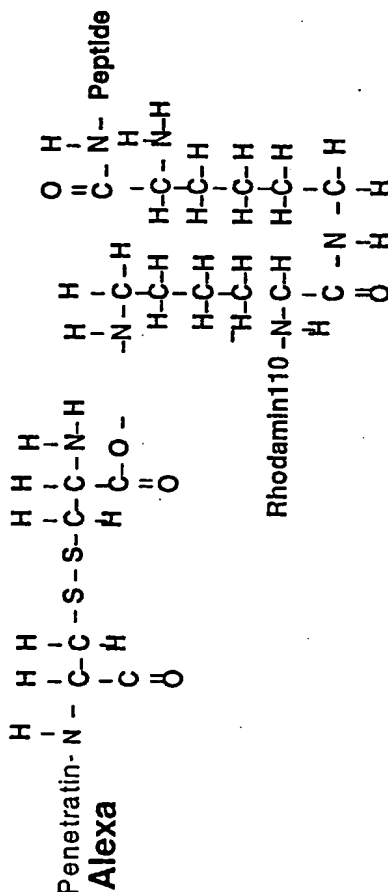
Modul 2: (MW 2597)  
H-S-CyONH- NLS- NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH NH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHNH<sub>2</sub>- CO-NH-Peptid (Drug,PNA)

-2H ↓ DMSO 20%/5h (Kopplung) / Reinheit: 90 - 95 % IIIII

Alexa-Penetratin-Cy-S-CyONH- NLS- NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHNH<sub>2</sub>- CO-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHNH<sub>2</sub>- CO-NH-Peptid (Drug,PNA)

FITC	Transport	Redox-Spaltung	Nukl.Loc.Sequ.	Lysin-Spacer
				ε-NH-Rhodamin110
				(Random-)Modelipeptid

Penetratin: P: (pAntp): NH<sub>2</sub>RQIKIWFQNRMRMKWKK-COOH



Penetratin: P: (pAntp):	Transportprotein	Cystin Redox-Trennstelle	Nuklear Localisation Sequenz	Spacer	Modelipeptid
NLS: (Nucl. Localis. Signal)					
PNA <sub>As</sub> :					
PNA <sub>NS</sub> :					

NH<sub>2</sub>RQIKIWFQNRMRMKWKK-COOH

NH<sub>2</sub>PKKKRKV-COOH

NH<sub>2</sub>TAC TGC GAC TCC GG-COOH

NH<sub>2</sub>TTA AGG AGG CTC-COOH

Fig. 6



# Proliferation AT-1

Zellzahl \* 10<sup>4</sup>

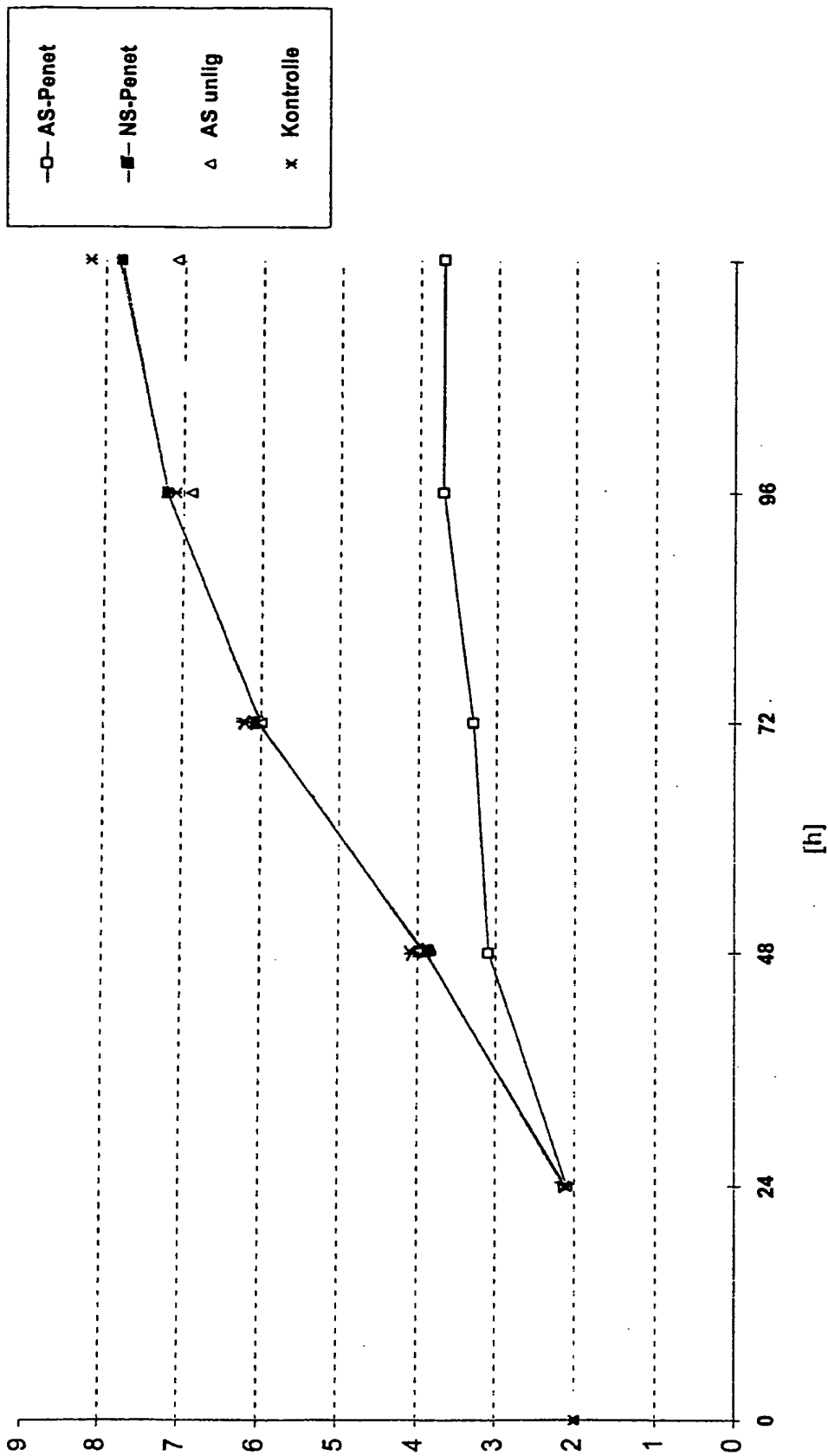


Fig. 7

Tabelle 1

Zeitabhängiger intrazellulärer Transport der Module. (Z): Zytoplasma; (N): Zellkern; (+): positives Signal; (-): kein Signal. Konjugat-Endkonzentration: 100 pM.

Transporter	Inkub.dauer [h]	Z	N	Methode
Alc <sub>23</sub> <sup>TM</sup> (L)-Penet-S-S-(L)-NLS-KK <sup>(Rhod110)</sup> -PNA	1	+	+	CLSM
	3	+	+	
	6	+	+	
	10	Membran-Spots Membran-Spots	+	
	24		+	
Alc <sub>23</sub> <sup>TM</sup> (L)-P <sup>1</sup> TT <sup>(TAT/III-V-1)</sup> -S-S-(L)-KK <sup>(Rhod110)</sup> -PNA	1	+	-	CLSM
	3	+	-	
	10	+	-	
	24	-	-	
Alc <sub>23</sub> <sup>TM</sup> (L)-TP <sup>1</sup> ANP/EC <sup>(n)</sup> -S-S-(L)-NLS-KK <sup>(Rhod110)</sup> -PNA	1	+	+	CLSM
	3	+	+	
	6	+	+	
	10	-	+	
	24	-	+	
Alc <sub>23</sub> <sup>TM</sup> (L)-TP <sup>1</sup> ANP/EC <sup>(n)</sup> -S-S-(L)-KK <sup>(Rhod110)</sup> -PNA	1	+	-	CLSM
	3	+	-	
	6	+	-	
	10	-	-	
	24	-	-	